

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



In re application of :
Helmut SCHWAB et al. :
Serial No. [NEW] : Attn: Application Branch
Filed January 16, 2002 : Attorney Docket No. 2001-1882A
NEW GENES CONTAINING A DNA :
SEQUENCE CODING FOR HYDROXY- :
NITRILE LYASE, RECOMBINANT :
PROTEINS DERIVED THEREFROM AND :
HAVING HYDROXYNITRILE LYASE :
ACTIVITY, AND USE THEREOF :

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
FEE FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
ACCOUNT NO. 23-0975.

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Assistant Commissioner for Patents,
Washington, DC 20231

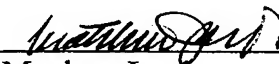
Sir:

Applicants in the above-entitled application hereby claim the dates of priority under the International Convention of Austrian Patent Application No. A60/2001, filed January 16, 2001, and Austrian Patent Application No. A523/2001, filed April 3, 2001, as acknowledged in the Declaration of this application.

Certified copies of said Austrian Patent Applications are submitted herewith.

Respectfully submitted,

Helmut SCHWAB et al.

By 
Matthew Jacob
Registration No. 25,154
Attorney for Applicants

MJ/pjm
Washington, D.C. 20006-1021
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
January 16, 2002

ACCOUNT NO. 23-0932
FEE FOR THIS PAPER TO DEPOSIT
TO CHARGE ANY DEFICIENCY IN THE
THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8 - 10



Aktenzeichen **A 60/2001**

Gebührentrei
gem. § 14, TP 1. Abs. 3
Geb. Ges. 1957 idgF.

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma DSM Fine Chemicals Austria GmbH
in A-4021 Linz, St. Peter-Straße 25
(Oberösterreich),**

am **16. Jänner 2001** eine Patentanmeldung betreffend

**"Neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrillyase kodierende
DNA-Sequenz, daraus abgeleitete rekombinante Proteine mit
Hydroxynitrillyase-Aktivität und deren Verwendung",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 29. Oktober 2001

Der Präsident

i. A.



HRNCIR
Fachoberinspektor

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

..... 760.- S 55.23.. €

Kanzleigebühr bezahlt.

Balham

A

60/2001

51 Int. Cl. :

001257

Untext

AT PATENTSCHRIFT

11 Nr.

73 Patentinhaber: DSM Fine Chemicals Austria GmbH

54 Gegenstand : Neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrillyase kodierende DNA-Sequenz, daraus abgeleitete rekombinante Proteine mit Hydroxynitrillyase-Aktivität und deren Verwendung

61 Zusatz zu Patent Nr.

67 Umwandlung aus GM

62 Ausscheidung aus :

22 21 Angemeldet am:

33 32 31 Unionspriorität :

42 Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

45 Ausgegeben am :

72 Erfinder :

60 Abhängigkeit:

56 Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

Neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrillyase kodierende DNA-Sequenz, daraus abgeleitete rekombinante Proteine mit Hydroxynitrillyase-Aktivität und deren Verwendung

Biokatalytische Verfahren haben für die chemische Industrie eine hohe Bedeutung erlangt. Die Durchführung chemischer Reaktionen unter Zuhilfenahme biologischer Katalysatoren ist dabei vor allem in solchen Anwendungsgebieten von Interesse, in denen die oft vorhandene Eigenschaft von Enzymen, bei chemischen Reaktionen mit chiralen oder prochiralen Komponenten eines der beiden Enantiomeren bevorzugt umzusetzen oder zu bilden, genutzt werden kann.

Wesentliche Voraussetzungen für die Nutzung dieser günstigen Eigenschaften von Enzymen sind ihre Verfügbarkeit in technisch benötigten Mengen und eine ausreichend hohe Reaktivität, sowie Stabilität unter den realen Bedingungen eines technischen Verfahrens.

Eine besonders interessante Klasse von chiralen chemischen Verbindungen sind Cyanhydrine. Cyanhydrine sind beispielsweise bei der Synthese von α -Hydroxysäuren, α -Hydroxyketonen, β -Aminoalkoholen, die zur Gewinnung biologisch wirksamer Stoffe, z.B. pharmazeutischer Wirkstoffe, Vitamine oder pyrethroider Verbindungen Verwendung finden, von Bedeutung.

Die Herstellung dieser Cyanhydrine erfolgt durch Addition von Blausäure an die Carbonylgruppe eines Ketons oder Aldehyds.

Die technische Herstellung von chiralen Verbindungen, wie etwa (S)-Cyanhydrinen, konnte durch die Erschließung des Enzyms (S)-Hydroxynitril Lyase aus *Hevea brasiliensis* realisiert werden und ist beispielsweise in WO 97/03204, EP 0 951561 und EP 0 927 766 beschrieben.

Es gibt jedoch eine Vielfalt an interessanten chemischen Verbindungen, bei welchen die R-Enantiomeren für technische Anwendungen von Bedeutung sind. Bisher wurden lediglich Verfahren zur Herstellung einer Reihe von Produkten beschrieben, die nur im Labormaßstab eingesetzt werden können (z.B.: EP 0 276 375, EP 0 326 063, EP 0 547 655). Dabei wurden vorwiegend Enzympräparationen eingesetzt, die aus Pflanzen der Familie Rosaceae, beispielsweise aus den Kernen von Mandeln (*Prunus amygdalus*) gewonnen wurden.

In letzter Zeit gewannen *Prunus* speizes immer mehr an Bedeutung, sodass versucht wurde, diese genauer zu erforschen.

Aus der Fachliteratur, beispielsweise aus Plant Physiology, April 1999, Vol 119, pp. 1535-1546, ist bekannt, dass in *Prunus spezies* mehrere R-Hnl Isoenzyme vorkommen können. Diese Isoenzyme sind in verschiedenen Geweben der Pflanze unterschiedlich stark exprimiert. Bei der zu *Prunus amygdalus* nahe verwandten Pflanze *Prunus serotina* konnten bislang 5 verschiedene Isoenzyme identifiziert und deren Gene sequenziert werden. Von *Prunus amygdalus* ist bislang nur ein Isoenzym in Planta (1998) 206: 388-393 beschrieben worden, nämlich eines das in der Blütenknospe am stärksten exprimiert ist. Ein Gen für dieses R-Hnl Isoenzyme wurde bereits isoliert und die cDNA sequenziert.

Es ist jedoch noch kein Bericht einer erfolgreichen (funktionellen) heterologen Expression eines solchen Gens in der Fachliteratur oder Patentliteratur beschrieben.

Auch technische Anwendungen im größeren Maßstab sind bislang nicht realisiert worden. Die wesentliche Ursache dafür ist, dass Enzympräparationen aus Mandelkernen mit Hydroxynitrillyase-Aktivität bisher nicht in ausreichenden Mengen und zu vertretbaren Kosten verfügbar waren.

Ziel dieser Erfindung war es daher eine Basis zu schaffen, die eine R-Hydroxynitrillyase in für technische Anwendungen benötigten Mengen bereitstellen kann.

Zur Erreichung dieses Zieles wurde ein Weg gesucht, ein der R-Hnl Präparation von *Prunus amygdalus* entsprechendes Enzym durch gentechnische Strategien mit Hilfe eines entsprechenden rekombinanten Mikroorganismenstammes zu produzieren. Ein solches rekombinates Enzym mit R-Hnl Aktivität sollte auf diese Art in ausreichender Menge technisch verfügbar gemacht werden.

Aus den in obiger Literatur beschriebenen DNA Sequenzen kann abgeleitet werden, dass bei den Genen der verschiedenen Isoenzyme bestimmte Bereiche hoch konserviert sind. Das wird erfindungsgemäß als Grundlage herangezogen, Primer für die PCR-Amplifikation von *P. amygdalus* R-Hnl Genen zu generieren. Mit Hilfe solcher Primer können dann mit aus Mandelkernen (*P. amygdalus*) isolierter DNA als Template (Vorlage) mittels PCR DNA-Stücke amplifiziert werden, die bei Analyse durch

Agarose-Gelelektrophorese konkrete spezifische Banden zeigen. Erfindungsgemäß waren dabei Banden zu finden, die der Größe von *mdl* Genen (Planta (1998) 206: 388-393) entsprachen. Anschließend werden entsprechende Primer für alle bei *Prunus serotina* bekannten Isoenzyme generiert und entsprechende PCR Produkte gewonnen. DNA aus diesem Bereich wird aus entsprechenden präparativen Agarosegelen isoliert und in Standardvektoren für die Klonierung von PCR-generierten Fragmenten in *Escherichia coli* einkloniert.

Die Sequenzanalyse von einer Serie ausgewählter Klone ergab, dass Klone mit Homologien zu den jeweiligen bereits bekannten R-Hnl Genen von Prunusarten vorhanden sind, obwohl sich die Sequenzen der so erhaltenen Klone bzw. Gene in mehreren Sequenzpositionen von den bereits bekannten bzw. publizierten Sequenzen unterscheiden, wodurch wichtige funktionelle Unterschiede festgelegt werden.

Es wurde daher unerwarteterweise eine neue Variante der Hnl Gene gefunden, obwohl Primerkombinationen verwendet wurden, bei der die bereits bekannte Sequenz einer aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA herangezogen wurde.

Die neuen Gene wurden sequenziert und die genomische DNA-Sequenz ermittelt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrilase kodierende DNA-Sequenz, herstellbar durch eine Primerkombination aus einem Primer basierend auf der DNA-Sequenz der aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA und einem Primer basierend auf einer der DNA-Sequenzen der Isoenzyme aus *Prunus serotina*, anschließende Amplifikation und Klonierung.

So können beispielsweise genspezifische PCR Primer basierend auf der Sequenzhomologie des *mdl5* Gens von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* hergestellt werden, worauf nach Amplifikation und Klonierung ein neues Gen, das *hnl5* Gen, erhalten wird.

Beispielsweise weist das durch PCR-Amplifikation gewonnene *hnl5* Gen aus *Prunus amygdalus* die in Figur 1 abgebildete Nukleotidsequenz auf, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist. Gegenstand der Erfindung sind auch *hnl5* Gene, die eine

Nukleotidsequenz aufweisen, die zumindest zu 80%, bevorzugt zu 85%, identisch ist mit der in Fig. 1 abgebildeten Sequenz.

Das neue *hnl5* Gen unterscheidet sich von der publizierten Sequenz des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* in 7 Basenpaaren.

In Analogie können erfindungsgemäß weitere genspezifische PCR Primer, beispielsweise basierend auf der Sequenz der bekannten *mdl1*-, *mdl2*-, *mdl3*- und *mdl4*-Gene von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus* hergestellt werden, worauf nach Amplifikation und Klonierung weitere neue Gene, wie etwa *hnl1-4*, erhalten werden, die alle Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind.

Die genomischen Klone bzw. deren genomische DNA stellen die Basis für die Gewinnung von Enzympräparationen durch heterologe Expression, beispielsweise durch induzierbare oder konstitutive Expression, in verschiedenen Wirtszellen dar.

Weiters ist aus der Sequenzanalyse der genomischen DNA der neuen, erfindungsgemäßen Gene ersichtlich, dass es sich bei dem von den neuen Genen kodierten Proteinen um Proteine handelt, die über eine Signalsequenz bzw. ein pflanzliches Signalpeptid verfügen, wodurch auch eine sekretorische Expression von heterologen Proteinen in geeigneten Wirtszellen ermöglicht wird.

Dabei werden spezielle Expressionsvektoren verwendet, mit denen das von einem der einklonierten neuen Gene codierte Protein als Fusionsprotein mit einem Signalpeptid exprimiert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach weiters rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression der genomischen DNA-Sequenz der *hnl* Gene (beispielsweise *hnl1*, *hnl2*, *hnl3*, *hnl4* und *hnl5*;) aus *Prunus amygdalus* in geeigneten Wirtszellen.

Geeignete Wirtszellen sind dabei beispielsweise Mikroorganismen. Bevorzugt sind eukaryotische Mikroorganismen, besonders bevorzugt Pilze. Beispiele dafür sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.

Beispielsweise ist die aus der Nukleotidsequenz des *hnl5* Gens abgeleitete Aminosäuresequenz der Hydroxynitrillyase Hnl5 aus *Prunus amygdalus* in Figur 3 dargestellt.

Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung einer DNA-Sequenz, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, zur sekretorischen Expression von heterologen Proteinen in Wirtszellen und die derart gewonnenen Proteine.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind demnach Fusionsproteine bzw. heterologe Proteine, die durch Verwendung einer DNA-Sequenz, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, und durch sekretorische Expression derselben in geeigneten Wirtszellen herstellbar sind.

Geeignete Wirtszellen sind dabei wiederum beispielsweise Mikroorganismen. Bevorzugt sind Bakterien oder eukaryotische Mikroorganismen, besonders bevorzugt Pilze, wie etwa *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.

Beispielsweise ist die Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments, bestehend aus Sequenzen des *hnl5* Gens von *P. amygdalus* und dem Glukoseoxidase-Gen von *Aspergillus niger* in Figur 4 abgebildet. Die aus der Nukleotidsequenz (Figur 4) abgeleitete Aminosäuresequenz des Hybridproteins PamHNL5xGOX ist in Figur 5 dargestellt.

Figur 6 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hnl5 Proteine aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX.

Um zu den erfindungsgemäßen rekombinanten Proteinen zu gelangen, werden beispielsweise die Klone, die Homologien zu den bekannten Genen für mdl1, mdl2, mdl3, mdl4 und mdl5 von *P. serotina* und MDL1 von *P. amygdalus* zeigen, weiter bearbeitet.

Um rekombinante Proteine mit Hydroxynitrillyase Aktivität zu erhalten werden die entsprechenden Gene z.B. das *hnl5* Gen, z.B. in einen Expressionsvektor für *Pichia pastoris* oder für *Saccharomyces cerevisiae* eingebaut.

Zuvor kann die genomische DNA mittels PCR gespleisst werden. Bevorzugt wird ein Basisfragment zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für die heterologe Expression des entsprechenden Gens in Bakterien und Eukaryonten hergestellt. Dazu wird ein Plasmid konstruiert, aus dem ein für ein erfindungsgemäßes Gen kodierendes DNA Fragment für den Einbau in verschiedene Expressionsvektoren durch Ausschneiden mit Restriktionsendonukleasen gewonnen werden kann.

Mit den erfindungsgemäßen Genen kann somit durch Expression, beispielsweise mit einem induzierbaren Promotersystem oder einem konstitutiv exprimierenden Promotorsystem, in einem heterologen Wirt eine funktionelle HnI produziert werden.

Aus einer großen Anzahl von Transformanten können somit rekombinante Stämme von beispielsweise *Pichia pastoris* gefunden werden, die rekombinantes Protein mit R-HnI Aktivität überexprimieren. Das Protein mit R-HnI Aktivität ist bei diesen Stämmen nach Induktion der Expression zum überwiegenden Teil im Kulturüberstand zu finden.

Somit konnte erstmals ein rekombinantes Protein in für technische Anwendungen nutzbaren Mengen hergestellt werden, das eine zu in Mandelkernen (Kerne von *Prunus amygdalus*) aufzufindende vergleichbare R-HnI Aktivität aufweist.

Unerwarteterweise konnte festgestellt werden, dass die rekombinanten Proteine mit R-HnI Aktivität, die sich beispielsweise von den erfindungsgemäßen *hnl1-5* Genen ableiten und mit Pam-HnI1-5 bezeichnet werden, im Vergleich zum aus Mandelkernen isolierten Enzympräparat wesentlich bessere Eigenschaften als Biokatalysator in Reaktionsansätzen zur Herstellung von Cyanhydrinen aufweisen und somit besonders vorteilhaft für die biokatalytische Synthese von Cyanhydrinen verwendet werden können.

Die Sequenzen der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine können weiters auch noch am C-terminalen Ende verkürzt werden, bzw. können die Sequenzen im N- und C-terminalen Bereich durch solche eines verwandten Proteins mit anderen Funktionen ausgetauscht werden. Derart abgewandelte Proteine sind demnach auch ein Gegenstand der Erfindung.

Die rekombinanten Proteine zeichnen sich insbesondere auch dadurch aus, dass sie eine wirtsspezifische Glykosilierung aufweisen, wodurch die rekombinanten Proteine wesentlich stabiler sind als die nativen Proteine.

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine ergibt sich durch die wesentlich höhere Stabilität, durch die wesentlich weniger Enzymmenge im Vergleich zu nativem Enzym benötigt wird um hohe Enantiomerenreinheit zu erzielen. So zeigten Vergleichsversuche, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine lediglich ein Zehntel der benötigten Menge an nativem Protein benötigt wird, um vergleichbare Enantiomerenreinheiten (ee-Werte) zu erzielen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist demnach die Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine (HNLs) zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen.

Als Ausgangsmaterialien zur Herstellung der (R)-Cyanhydrinen werden ein Aldehyd oder ein Keton als Substrat, ein Cyanidgruppendonator und ein erfindungsgemäßes rekombinantes Protein eingesetzt.

Unter Aldehyden sind dabei aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Aldehyde zu verstehen. Unter aliphatischen Aldehyden sind dabei gesättigte oder ungesättigte, aliphatische, geradkettige, verzweigte oder cyclische Aldehyde zu verstehen. Bevorzugte aliphatische Aldehyde sind geradkettige Aldehyde mit insbesondere 2 bis 30 C-Atomen, bevorzugt von 2 bis 18 C-Atomen, die gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sind. Der Aldehyd kann dabei sowohl C-C-Doppelbindungen als auch C-C-Dreifachbindungen aufweisen. Die aliphatischen, aromatischen oder heteroaromatischen Aldehyde können weiters unsubstituiert oder durch unter den Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen, wie Phenyl-, Phenoxy- oder Indolylgruppen, durch Halogen-, Hydroxy-, Hydroxy-C₁-C₅-Alkyl, C₁-C₅-Alkoxy-, C₁-C₅-Alkylthio-, Ether-, Alkohol-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidogruppen substituiert sein.

Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Aldehyde sind Benzaldehyd bzw. verschieden substituierte Benzaldehyde wie etwa 3,4-Difluorbenzaldehyd, 3-Phenoxybenzaldehyd, 4-Fluor-3-phenoxybenzaldehyd, Hydroxybenzaldehyd, Methoxybenzaldehyd, weiters Furfural, Methylfurfural, Anthracen-9-carbaldehyd, Furan-3-carbaldehyd, Indol-3-carbaldehyd, Naphthalin-1-carbaldehyd, Phthaldialdehyd, Py-

razol-3-carbaldehyd, Pyrrol-2-carbaldehyd, Thiophen-2-carbaldehyd, Isophthalaldehyd oder Pyridinaldehyde, Thienylaldehyde u.s.w..

Ketone sind aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Ketone, bei denen das Carbonylkohlenstoffatom ungleich substituiert ist. Unter aliphatischen Ketonen sind gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Ketone zu verstehen. Die Ketone können gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein. Sie können unsubstituiert, oder durch unter Reaktionsbedingungen inerte Gruppen, beispielsweise durch gegebenenfalls substituierte Aryl- oder Heteroarylgruppen wie Phenyl- oder Inolylgruppen, durch Halogen-, Ether-, Alkohol-, Carbonsäureester-, Nitro- oder Azidgruppen substituiert sein.

Beispiele für aromatische oder heteroaromatische Ketone sind Acetophenon, Indolylaceton u.s.w..

Aldehyde und Ketone, die sich erfindungsgemäß eignen, sind bekannt oder wie üblich herstellbar.

Die Substrate werden in Anwesenheit der erfindungsgemäßen HNLs mit einem Cyanidgruppendifferenzierender umgesetzt.

Als Cyanidgruppendifferenzierender kommen Blausäure, Alkali-Cyanide oder ein Cyanhydrin der allgemeinen Formel I



in Betracht. In der Formel I bedeuten R_1 und R_2 unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine unsubstituierte Kohlenwasserstoffgruppe, oder R_1 und R_2 gemeinsam eine Alkylengruppe mit 4 oder 5 C-Atomen, wobei R_1 und R_2 nicht gleichzeitig Wasserstoff bedeuten. Die Kohlenwasserstoffgruppen sind aliphatische oder aromatische, bevorzugt aliphatische Gruppen. Bevorzugt bedeuten R_1 und R_2 Alkylgruppen mit 1 - 6 C-Atomen, ganz bevorzugt ist der Cyanidgruppendifferenzierender Acetoncyanhydrin.

Die Herstellung des Cyanidgruppendifferenzierenders kann nach bekannten Verfahren erfolgen. Cyanhydrine, insbesondere Acetoncyanhydrin, sind auch käuflich zu erwerben.

Bevorzugt wird Blausäure (HCN), KCN, NaCN, oder Acetoncyanhydrin, besonders bevorzugt Blausäure als Cyanidgruppendifferenzierender eingesetzt.

Die Blausäure kann dabei auch erst kurz vor der Reaktion aus einem ihrer Salze wie etwa NaCN oder KCN freigesetzt und in Substanz oder in gelöster Form dem Reaktionsgemisch zugegeben werden.

Die Umsetzung kann im organischen, wäßrigen oder 2-Phasensystem oder in Emulsion durchgeführt werden.

Als wäßriges System wird eine wäßrige, die erfindungsgemäße HNL enthaltende Lösung oder Pufferlösung verwendet. Beispiele dafür sind Na-Citratpuffer, Phosphatpuffer u.s.w.

Als organisches Verdünnungsmittel können mit Wasser nicht oder geringfügig mischbare aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, die gegebenenfalls halogeniert sind, Alkohole, Ether oder Ester oder Gemische davon verwendet werden. Bevorzugt werden Methyl -tert. Butylether (MTBE), Diisopropylether, Dibutylether und Ethylacetat oder deren Gemisch eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen HNLs können dabei entweder als solche oder immobilisiert in dem organischen Verdünnungsmittel vorliegen, die Umsetzung kann jedoch auch in einem Zweiphasensystem oder in Emulsion mit nicht-immobilisierter HNL erfolgen.

Beispiel 1:

Isolierung von genomischer DNA aus Mandelkernen (Kerne von *Prunus amygdalus*)

Getrocknete Mandelkerne (Farmgold, Chargennummer L4532, Ernte 1999) wurden mit einem Messer fein gehackt und in einer Reibschale mit flüssigem Stickstoff eingefroren und unter flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zu einem feinen Pulver aufgerieben. 0,1 Gramm gefrorenes Mandelkernpulver wurden direkt mit 65 °C warmem „Breaking Puffer“ (100 mM NaAc; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl, eingestellt auf pH 5,5; 1,4% SDS und 20µg / ml RNase A) versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation unter ständigem Schütteln wurden die unlöslichen Zellrückstände durch Zentrifugation (10 min. bei 7000 g) abgetrennt und der Überstand mit einem gleichen Volumen 10M Ammoniumacetat versetzt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 10.000g wurde der Überstand 2 x mit Phenol/Chloroform (1/1, Phenol äquilibriert mit 50 mM Tris, pH 8.0) extrahiert. Nach einer weiteren Extraktion mit doppeltem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) wurde die DNA aus dem Überstand mit einem gleichen Volumen Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, das DNA Pellet mit 70% Äthanol gewaschen und luftgetrocknet. Die DNA wurde dann für 20 min bei 68°C in 200 µl Wasser gelöst und durch eine Ethanolfällung (Ausubel et al., 1999) gereinigt. Nach der Zentrifugation wurde das DNA Pellet luftgetrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

Beispiel 2:

Amplifikation und Klonierung eines genomischen DNA Abschnittes von Mandel (*Prunus amygdalus*) DNS mit Homologie zu bekannten *mdl* Genen von Rosaceae.

Da bekannt war, dass in *Prunus spezie*s mehrere Isoenzyme von Hydroxynitrilylasen mit hoher Sequenzhomologie zueinander auftreten können (Hu und Poulton, 1999), wurden genspezifische PCR Primer basierend auf der Sequenzhomologie des *mdl5* Gens von *Prunus serotina* und des *MDL1* Gens von *Prunus amygdalus* (Suelves et al., 1998) hergestellt:

Primer 1: 5'- CGGAATTCACAATATGGAGAAATCAACAATGTCAG-3'

Primer 2: 5'- CGGAATTCTTCACATGGACTCTTGAATATTATG-3'

Die Amplifikation erfolgte in einem 50 µl Ansatz mit 1,2 U „Hotstar“ *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland), mit 50 ng genomischer Mandel-DNA als „Template“, je 200 ng Primer 1 und 2, 5 µl eines dNTP (je 2 mM) Mix, alles in 1x PCR Puffer entsprechend dem Manual des „Hotstar Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland), beginnend mit einem 15 minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen (1 min 95°C, 30 sec 64°C, 1 min 72°C) zur Amplifikation und einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte.

Durch diese PCR wurde ein DNA Fragment in der Grösse von ca. 2,16 kb (festgestellt durch Analyse mittels Agrose-Gelelektrophorese) erhalten. Dieses PCR Produkt wurde mittels „Qiaquick Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem beigefügten Manual gereinigt und unter Verwendung des „Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing“ Kits (Applied Biosystems Inc., Forster City, CA, USA) nach der Strategie des „Primer walking“ ausgehend von den beiden zur PCR eingesetzten Primern sequenziert. Die erhaltene DNA Sequenz des insgesamt 2162 Basenpaare langen PCR Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

Ca. 0,5 µg des gereinigten PCR Produktes wurden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten und in den Plasmidvektor pBSSK(-) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) über die *EcoRI* Schnittstelle einkloniert. Das Insert eines resultierenden rekombinanten Moleküls (das entsprechende Plasmid wurde mit pBSPamHNL5g bezeichnet) wurde nach der oben beschriebenen Methode sequenziert und die Sequenz des klonierten Fragmentes war zu 100 % ident mit der Sequenz des oben beschriebenen mit den beiden Primern (1 & 2) erhaltenen PCR Produktes.

Beispiel 3:

Sequenzanalyse des durch PCR Amplifikation mit den Primern 1 und 2 erhaltenen genomischen *Prunus amygdalus* DNA Fragmentes.

Im Bereich des durch PCR amplifizierten und sequenzierten DNA Abschnitts wurde ein offener Leserahmen gefunden, der durch 3 Introns unterbrochen ist. Diese drei

Introns wurden mit Hilfe der Intron Consensus Sequenz „GT.....AG“ identifiziert. Der Leserahmen beginnt mit einem ATG Codon bei Position +13 und endet mit einem Stop Codon bei Position +2151.

Für den kodierenden Bereich wurden die Fragmente von Position 13 bis 115 (Exon I), Position 258 bis 917 (Exon II), 1121 bis 1961 (Exon III) und 2078 bis 2150 (Exon IV) zusammengefügt. Die zusammengefügte DNA Sequenz kodiert für ein Protein mit 559 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 61 kDa, bzw. 57, 9 kDa für eine N-terminal prozessierte Form. Die Peptidmassen wurden mit Hilfe des Programmpakets GCG (Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) berechnet. Für dieses Protein wurde die Bezeichnung *PamHnl5* festgelegt.

Die für den offenen Leserahmen (ohne Introns) abgeleitete Proteinsequenz ist in Figur 3 gezeigt. Es konnten ausgeprägte Homologien zu bekannten Hydroxynitrilysasen von *Rosaceae* festgestellt werden („Blast“ Programm, GCG Paket, Version 10.1, Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) wobei die höchsten Homologien zu den publizierten Sequenzen von Mdl1 aus *Prunus amygdalus* (99 prozentige Identität, Suelves et al. 1998) und von Mdl5 aus *Prunus serotina* (94 prozentige Identität, Hu und Poulton, 1999) bestehen. Mit Hilfe dieser Homologie wurde auch eine spaltbare Signalsequenz mit Spaltung zwischen S27 und L28 identifiziert. Eine solche Spaltstelle konnte bei den beiden Isoenzymen Mdl1 und Mdl4 von *Prunus serotina* durch N-terminale Sequenzierung der aus Pflanzenmaterial gereinigten nativen Proteine nachgewiesen werden (Zihua Hu und Jonathan E. Poulton, Plant Physiology, 119, 1535 – 1546, 1999). Die Sequenzen von verschiedenen in *Rosacea species* vorhandenen HNL Isoenzymen sind nur von *Prunus serotina* bekannt. Aufgrund der höchsten Homologien zur Sequenz von Mdl5 aus *Prunus serotina* wurde das neue *hnl* Gen aus *Prunus amygdalus* als *hnl5* festgelegt. Die Suche nach Sequenzmotiven in der PROSITE-Sequenzmotiv Datenbank (GCG Paket, Version 10.1, Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) ergab das Vorhandensein von 13 potentiellen N-Glykosilierungsstellen (in Figur 3 eingezeichnet).

Beispiel 4:

Gewinnung eines intronfreien *Prunus amygdalus hnl5* Gens durch PCR Splicing. Mittels einer speziellen PCR Strategie unter Verwendung von überlappenden Pri-

mern wurden die kodierenden Bereiche durch 4 aufeinanderfolgende PCR Reaktionen miteinander verbunden (entsprechend Figur 2).

In der ersten PCR Runde (PCR1-1 und PCR1-2) wurden die Exons II und III mit den Primerpaaren PamHNL5b/PamHNL5c (PCR1-1) bzw. PamHNL5d/PamHNL5e (PCR1-2) amplifiziert. Die 50 µl PCR Ansätze in 1x PCR Puffer (Qiagen) enthielten: je 100 pmol der entsprechenden Primer, 2,5 U „Hotstar“ Taq DNA Polymerase (Qiagen), 5 µl eines dNTP (je 2 mM) Mix, 10 ng des Plasmids pBSPamHNL5g als Template. Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte). Die Produkte aus PCR1-1 und PCR1-2 wurden nach elektrophoretischer Trennung in einem Agarosegel mittels QiaexII Kit aus dem Gel eluiert.

Durch Amplifikation von ca. 50 ng des Produktes aus PCR1-1 mit je 100 pmol der Primer PamHNL5a2 und PamHNL5c erfolgte in der zweiten PCR-Runde (PCR2) eine Verlängerung dieses ersten PCR Produktes. Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte). Die sonstigen Bedingungen waren gleich wie bei PCR1. Dieses PCR Produkt wurde nach elektrophoretischer Trennung ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt und eluiert

Durch primerlose PCR wurden in der dritten PCR-Runde (PCR3) die Produkte aus PCR1-2 und PCR2 mit Hilfe der überlappenden Enden miteinander verbunden (5 Zyklen mit 1 min bei 94°C, 30 sec bei 68°C und 1,5 min 72°C, je ca. 100 ng der beiden Produkte aus PCR1-1 und PCR2 in 50 µl Ansätzen in 1x PCR Puffer (Qiagen), 5 µl des dNTP (je 2 mM) Mix und 2,5 U „Hotstar“ Taq DNA Polymerase (Qiagen).

Die Ergänzung zur vollen Länge des kodierenden *Prunus amygdalus hnl5* Gens und zur Amplifikation des vollständigen Produktes erfolgte in einer vierten PCR-Runde (PCR4) mit je 100 pmol der Primer PamHNL5a1 und PamHNL5f. Diese wurden direkt zum Reaktionsgemisch der PCR 3 zugegeben. Es wurde folgendes Programm gefahren: 20 Zyklen mit 1 min 95 °C, 30 sec. 63°C, 1,5 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C). Die sonstigen Bedingungen waren gleich wie bei PCR1.

Das in der letzten PCR-Runde erhaltene Produkt wurde über ein präparatives Agarsegel aufgetrennt und die DNA mit einer Grösse von 1,6 – 1,8 kb mittels „QuiaexII“ Kit (Qiagen) aus dem Gel eluiert und über die *EcoRI* Schnittstelle in das Plasmid pBSSK(-) einkloniert. Ein Klon mit korrektem Restriktionsmuster wurde ausgewählt und sequenziert.

Die Sequenz im kodierenden Bereich war zu 100 % ident mit den Exons der genomischen DNA Sequenz. Dieser Klon wurde als pBSPamHNL5orf bezeichnet.

Oligonukleotid-Primer

PamHnl5a1

5'-

GAAGATCTGAATTCCATGGAGAAATCAACAATGTCAGTTATACTATTTGTGTTGC
ATCTTCTTG-3'

PamHnl5a2

5'-

CTATTTGTGTTGCATCTTCTTGTTCTTCATCTTCAGTATTCAGAGGTTCACTCGCT
TGCCAATACTTC-3'

PamHnl5b

5'-

GTTCACTCGCTTGCCAATACTTCTGCTCATGATTTTAGCTACTTGAAGTTTGTGT
ACAACGCCACTG-3'

PamHnl5c

5'-GATGTATTGGAAGAGAAGAGGATCTTCTCTACT-3'

PamHnl5d

5'

GATCCTCTTCTCTTCCAATACATCAAATTTGTCAGCTATTGGAGTCATATATACG
G 3'

PamHnl5e

5'-

CAACCGGATTGACCTTTCTTGCAGGATTGAAGGCCACATACCTTCCTAACATC
AGATAGAAGCC-3'

PamHnl5f

5'-

GAAGATCTGGAATTCTTCACATGGACTCTTGAATATTATGAATAGCCTCCAACCG
GATTGACCTTTCTTGCAG-3'

Beispiel 5

Herstellen eines Basisfragments zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für heterologe Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in Bakterien und Eukaryonten.

Ziel dieses Experiments war die Konstruktion eines Plasmides, aus dem ein für *Prunus amygdalus hnl5* kodierendes DNA Fragment für den Einbau in verschiedene Expressionsvektoren durch Ausschneiden mit Restriktionsendonukleasen gewonnen werden kann. Dabei wurden durch PCR Amplifikation über entsprechende Primer an den Enden des in pBSPamHNL5orf enthaltenen *Prunus amygdalus hnl5* Gens geeignete Sequenzen addiert.

Mit den Primern PCRHNL5-a und PCRHNL5-e wurde das Insert des Plasmids pBSPamHNL5orf mittels PCR amplifiziert (10 ng DNA des Plasmids pBSPamHNL5orf als Template, 400 ng Primer PCRHNL5-a, 200 ng Primer PCRHNL5-e). Die PCR Reaktion erfolgte in 50 µl Ansätzen in 1x PCR Puffer (Qiagen), enthaltend 5 µl des dNTP (je 2 mM) Mix und 1,2 U „Hotstar“ *Taq* DNA Polymerase (Qiagen). Es wurde folgendes Programm gefahren: 15 min 95 °C, 30 Zyklen 1 min 95 °C, 30 sec. 68°C, 1,5 min 72 °C und zum Abschluss 5 min 72 °C zur Herstellung vollständiger Produkte.

Das erhaltene DNA Fragment wurde nach Schneiden mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* in den Vektor pBSSK(-) (Stratagene, USA) einkloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Das resultierende Plasmid wurde pBSPamHNL5ex benannt.

Oligonukleotid-Primer:

PCRHNL5-a

5'-

TCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTA
AGAAGGAGATATACATATGGAGAAATCAACAATGTCAGTTATACTATTTGTGTTG
CATC-3'

PCRHNL5-e

5'-

CGAATTCGCCCTTTTCGCATGCTCACATGGACTCTTGAATATTATGAATAGCCTC-
3'

Beispiel 6

Konstruktion von Expressionskonstrukten zur heterologen Expression des *hnl5* Gens in *Pichia pastoris*.

DNA des Plasmids pBSPamHNL5ex wurde mit *EcoRI* geschnitten und das *hnl*-Fragment vom Vektoranteil mittels präparativer Gelelektrophorese getrennt. Nach Elution der *hnl*-Fragment DNA mittels Qiaex II Kit (Qiagen) wurde dieses über die *EcoRI* Schnittstellen in die Plasmide pHILD2 und pGAPZ (Invitrogen, San Diego, CA, USA) einkloniert. Die richtige Orientierung der Inserts zu den Promotoren wurde mit Hilfe von Kontrollschnitten überprüft. Jeweils ein Klon mit einem korrekt orientierten Insert wurde ausgewählt und konserviert. Die korrekten Übergänge vom Vektoranteil zum eingebauten *hnl*-Fragment wurden durch Sequenzierung verifiziert. Diese beiden entstandenen Expressionsplasmide für *Pichia pastoris* wurden als pHILD-PamHNL5a (für induzierbare Expression) und pGAPPamHNL5a (für konstitutive Expression) bezeichnet.

Beispiel 7

Induzierbare Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in *Pichia pastoris*

DNA des Plasmids pHILDPamHNL5a wurde mit der Restriktionsendonuklease *NotI* geschnitten und in *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) transformiert. Die Transformation erfolgte nach den Vorschriften des „Pichia Expression

Kit" (Invitrogen, San Diego, CA, USA). 100 Histidin-prototrophe Klone wurden nach den Vorschriften des „Pichia Expression Kit“ in Flüssigmedium (500 ml Schüttelkulturen) angezüchtet und 48 Stunden mit Methanol induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCL, pH 7,6) zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 50.0 suspendiert und nach der „Glaskugelmethode“ (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, 1999) in einem „Merckenschlager“ Homogenisator (Fa. Braun, Melsungen, BRD) aufgeschlossen. Sowohl die Kulturüberstände als auch die Zelllysate wurden auf Hnl-Enzym Aktivität mit einem Standard Aktivitätsassay (analog WO 97/03204) unter Verwendung von racemischem Mandelonitril als Substrat bestimmt. Zwei Klone, die bei diesen Schüttelkolbenexperimenten die besten Aktivitäten im Kulturüberstand zeigten (*Pichia pastoris* PamHNL5-a37 und *Pichia pastoris* PamHNL5-a4) wurden ausgewählt und konserviert. Eine Analyse des Methanolverwertungstyps ergab den Phänotyp Mut⁺ (gute Verwertung von Methanol) für *Pichia pastoris* PamHNL5-a37 und den Phänotyp Mut^s (langsame Verwertung von Methanol) für *Pichia pastoris* PamHNL5-a4.

Beispiel 8

Konstitutive Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens in *Pichia pastoris*

Das Plasmid pGAPPamHNL5a wurde in *P. pastoris* GS115 transformiert. Die Transformation erfolgte nach den Vorschriften des Pichia Expression Kit der Invitrogen Corp (San Diego, CA, USA). Die Selektion von Transformanten erfolgte auf YPD Vollmediumplatten mit 100 mg/l Zeocin. 100 Zeocin-resistente Klone wurden in je 500 ml YPD Vollmedium angezüchtet und 96 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Hnl Aktivität im Kulturüberstand bestimmt. Ein Klon der die beste Aktivität im Kulturüberstand zeigte wurde konserviert und mit *Pichia pastoris* PamHNL5-a2 bezeichnet.

Beispiel 9

Produktion von Hnl mit einem mit dem *hnl5* Gen aus *Prunus amygdalus* transformierten Stamm von *Pichia pastoris* (durch Methanol indizierbares Expressionssystem) im Laborbioreaktor.

Die Züchtung von *Pichia pastoris* PamHNL5-a37 erfolgte in einem Standard-Laborbioreaktor (42 L Gesamtvolumen) in einem dreiphasigen Verfahren. Dieses bestand aus einer ersten exponentiellen und einer zweiten linearen Wachstumsphase zur Bildung von Biomasse und einer anschließenden Expressionsphase zur Bildung des rekombinanten *Prunus amygdalus* Hnl Enzyms, wobei im Prinzip nach der für die Produktion von rekombinanter *Hevea brasiliensis* Hnl beschriebenen Methode (Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S.D., Schwab, H.: High level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression and Purification* **11**, 61-71, 1997) vorgegangen wurde.

Im Detail wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Die Chemikalien 1.-8., bemessen für 20 Liter wurden in 15 Liter Wasser gelöst im Bioreaktor vorgelegt und zusammen mit dem Reaktor bei 121°C für 1 Stunde sterilisiert. Nach Abkühlung auf 29°C wurde der pH Wert im Medium mit Ammoniak (Chemikaliu 9, in steriler Zulaufflasche vorgelegt) auf pH 5,0 eingestellt. Danach wurden ca. 200 ml einer steril filtrierten Spurenelemente-Lösung (Chemikalien 10-18, entsprechende Mengen für 20 L) über eine Zulaufflasche in den Bioreaktor eingebracht.

Der so vorbereitete Bioreaktor wurde mit 2 Liter Vorkultur, die in Schüttelkolben bei 30°C nach den im Handbuch des „Pichia Expression Kit“ (Invitrogen Corp., San Diego, CA, USA) angegebenen Bedingungen angezüchtet wurde, beimpft. Die Kultivierung wurde bei einer konstanten Temperatur von 29°C durchgeführt. Durch Regelung der Belüftung (zwischen 15 und max. 40 Lit Luft/min) und der Rührerdrehzahl (zwischen 250 bis 500 Upm) wurde der O₂-Partialdruck auf einem Wert von größer als 30% der Sättigungskonzentration gehalten. Nach 21 Stunden war die Biomasse auf einen Wert im Bereich von 22 g/L Zelltrockengewicht (ZTG) angewachsen. Ab diesem Zeitpunkt wurde steriles Glycerin in konstanten kleinen Portionen in Abständen von 15 min zudosiert, wobei pro Stunde 130 g Glycerin zugesetzt wurden. In

dieser zweiten linearen Wachstumsphase konnte in einem Zeitraum von 42 Stunden eine Biomassekonzentration im Bereich von 70 g/L ZTG erreicht werden.

Danach wurde die dritte Phase mit der Induktion der Expression durch Zudosierung von Methanol eingeleitet. Dabei wurde der Methanolgehalt in der Kulturbrühe auf einen Wert von 0,8-1 Gewicht % eingestellt. Zu Induktionsbeginn und nach zwei Tagen Induktion wurde jeweils eine weitere Portion sterile Spurenelementelösung (Chemikalien 10-18, entsprechende Mengen für 20 L, gelöst in ca. 200 ml Wasser) zugegeben. Nach 110 Stunden Induktionsphase konnte eine Enzymmenge von 110 U/ml Kulturbrühe erhalten werden. Nach Abtrennen der Zellen durch beispielsweise Zentrifugation kann eine Rohenzympräparation erhalten werden, die direkt für biokatalytische Umsetzungen eingesetzt werden kann.

Folgende Chemikalien wurden zur Herstellung des Kulturmediums benutzt (Menge pro Liter):

- | | |
|---|--------|
| 1. 85% ortho-Phosphorsäure | 21 ml |
| 2. CaSO_4 | 0,9 g |
| 3. K_2SO_4 | 14,3 g |
| 4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 12,2 g |
| 5. KOH | 3,3 g |
| (Chemikalien 1 bis 5 in p.a. Qualität) | |
| 6. Glycerin, technische Qualität. | 50 ml |
| 7. Entionisiertes Wasser, Hausqualität, Leitfähigkeit 5,5-9,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ | |
| 8. Antischaummittel 10 % Acepol 83E | 1ml |
| (Carl Becker Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland) | |
| 9. 25%Ammoniak, technische Qualität | |

Spurenelemente und Vitamin H (alle Chemikalien in p.a. Qualität) :

- | | |
|--|---------|
| 10. Biotin | 0,8 mg |
| 11. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 24,0 mg |
| 12. KI | 0,32 mg |
| 13. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 12,0 mg |
| 14. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,2 mg |

15. H_3BO_3	0,08 mg
16. CoCl_2	2,0 mg
17. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	80 mg
18. $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	260 mg

Beispiel 10:

Konstruktion eines Klonen zur Expression des *Prunus amygdalus hnl5* Gens als Fusionsprotein mit N-terminalen und C-terminalen Anteilen der Glukoseoxidase von *Aspergillus niger*.

Diese Konstruktion wurde so konzipiert, dass das gebildete Fusionsprotein über die heterologe Signalsequenz in den sekretorischen Weg gelenkt wird.

Durch eine PCR in einem 50 μl Ansatz in 1x PCR Puffer (Qiagen) mit je 100 pmol der Primer Glucox2 und Glucoxct, 10 ng Plasmid pPamHNL5orf als Template, 5 μl dNTP (je 2 mM) Mix, und 1,2 U „Hotstar“ Taq Polymerase (Qiagen) wurden das C-terminale und das N-terminale Ende des *hnl5* Gens durch eine von der Glukoseoxidase abgeleitete Sequenz ersetzt bzw. verkürzt. (Programm: 15 min 95 °C, 30 x: 1 min 95 °C, 1 min 68 °C, 2 min 72 °C, und zum Abschluss 10 min 72 °C)

In einer 2. PCR in einem 50 μl Ansatz in 1x PCR Puffer (Qiagen) mit 0,1 μl Produkt aus der ersten PCR als Template, je 100 pmol der primer Glucox1 und Glucoxct, 2 μl dNTP (je 2 mM) Mix, und 2,5 U Pwo Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), (Programm: 5 min 95 °C, 30 mal: 1 min 95 °C, 0,5 min 68 °C, 3 min 72 °C und zum Abschluss 3 min 72 °C) wurde abschließend der 5' Bereich des Gens ergänzt.

Über die gleichzeitig eingeführten *EcoRI* Schnittstellen an den Enden des DNA Fragments wurde das PCR Produkt nach Schneiden mit *EcoRI* in das Plasmid pHILD2 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) eingebaut. Ein Klon mit der richtigen Orientierung des Inserts zum *aox* Promoter des pHILD2 Plasmids wurde durch Sequenzieren der Übergangsbereiche von Vektor zu Insert verifiziert und konserviert. Das auf diese Weise konstruierte Plasmid wurde mit pHILDPamHNL5gox bezeichnet.

Mit *NotI* linearisierte DNA des Plasmids pHILDPamHNL5gox wurde in den Stamm *Pichia pastoris* GS115 sowie in den proteasedefizienten Stamm *Pichia pastoris*

SMD1168 transformiert. Von jedem Ansatz wurden mehrere Histidin-prototrophe Klone in Schüttelkolben kultiviert und die Hnl-Aktivität im Kulturüberstand (Standard-assay) bestimmt. Diese Experimente wurden analog wie in Beispiel 7 beschrieben durchgeführt. Im Kulturüberstand war bei einigen Klonen HNL Aktivität aufzufinden womit festgestellt werden konnte, daß die Signalsequenz des *Aspergillus niger* *gox* Gens befähigt ist, das heterologe Hnl5 Protein bei Expression in *Pichia pastoris* in den sekretorischen Weg zu dirigieren.

Verwendete Oligonukleotid-Primer

GLUCOX1

5'-

CACGAATTCATCATGCAGACTCTCCTTGTGAGCTCGCTTGTGGTCTCCCTCGCT
GCGGCCCTGCCACACTAC – 3'

GLUCOX2

5'-

TGCGGCCCTGCCACACTACATCAGGAGCAATGGCATTGAAGCCTACAACGCCA
CTGATACAAGCTCGGAAGGATC-3'

GLUCOXCT

5'-GAATTCGCATGCGGCCGCTCACTGCATTGACCTTTCTTGCAGGATTTGAAG-3'

Die Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments ist in Figur 4 dargestellt, die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Figur 5 wiedergegeben. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hnl5 aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX ist aus Figur 6 zu entnehmen.

Beispiel 11:

Rekombinantes Protein mit Hnl-Aktivität, das mit dem rekombinanten Stamm *Pichia pastoris* PamHnl5-a37 wie in Beispiel 9 beschrieben produziert wurde, wurde einer Analyse der Glykosylierung durch Verdau mit Endoglykosidasen unterzogen. Dazu

wurden 100 ml des Kulturüberstandes durch Ultrafiltration (Biomax 30,000 NMWL, Millipore, Bedford, MA, USA) 10 fach konzentriert. Die Proben 1-2 wurden mit N-Glycosidase F (N-Glykosidase F Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, D) behandelt. Bei den Proben 4-5 wurde eine HNL Präparation aus Mandeln der Fa. Roche verwendet und bei den Proben 6 und 7 wurde der aufkonzentrierte Kulturüberstand mit Endoglykosidase H (Roche, Diagnostics, Mannheim, D) behandelt. Alle Ansätze wurden in 10 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Std.	Molekulargewichtsstandard aus dem N-Glycosidase F Kit (5 µl = 5 µg)
Probe 1:	2 U <i>PamHnl5</i> mit 2,4 U Enzym nach Vorschrift des Kits behandelt.
Probe 2:	2 U <i>PamHnl5</i> mit 2,4 U Enzym nach Vorschrift des Kits jedoch ohne Denaturierungspuffer und ohne Hitzedenaturierung behandelt
Probe 3:	2 <i>PamHnl5</i> ohne Behandlung
Probe 4:	0,25 U der Roche R-HNL Präparation grade III aus Mandeln (10,3 U/mg) behandelt mit 2,4 U N-Glycosidase F nach Vorschrift des Kits
Probe 5:	0,25 U der Roche Präparation grade III (10,3 U/mg) unbehandelt
Probe 6	2,4 U <i>PamHnl5</i> wurden mit 50 mU Endoglykosidase H in 20 mM Phosphatpuffer, ohne Denaturierung für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.
Probe 7	2,4 U <i>PamHnl5</i> wurden mit 5 mU Endoglykosidase H in 20 mM Phosphatpuffer, 0,2% SDS, 0,4 % Merkaptoethanol für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach den Behandlungen mit den Glykosidasen wurden die Proben auf einem 12-prozentigen SDS-Polyacrylamid Gel getrennt und mit Commassie Blue gefärbt.

Diese Ergebnisse (siehe Figur 7) zeigen, dass ein Grossteil der an *PamHnl5* gebundenen Oligosaccharide durch Endoglykosidase H auch ohne Denaturierung des *PamHnl5* Proteins entfernt werden kann.

Durch die Abspaltung der Oligosaccharide entsteht aus einem bei Größen von 70 bis über 100 kDa sichtbaren Proteinschmier eine scharfe Bande bei etwa 60 kDa, was dem berechneten Molekulargewicht eines nicht glykosylierten *PamHnl5* Proteins entspricht.

Eine vergleichbare Proteinbande ist im Roche Präparat nicht oder nur in stark untergeordnetem Ausmass vorhanden. Außerdem kann kein signifikanter Unterschied

zwischen einer unbehandelten Proteinpräparation und einer mit Endoglykosidase F behandelten Präparation gesehen werden. Aus diesem Befund kann eindeutig festgestellt werden, dass sich das rekombinante *PamHnl5* Enzym komplett vom aus Mandelkernen gewonnenen Enzymmaterial unterscheidet.

Beispiel 12:

0,5 g (3,9 mmol) Octanal wurden in 6 ml tert-Butylmethylether gelöst und mit 7,5 ml einer wässrigen Enzymlösung mit rekombinanter R-HNL aus Beispiel 9 (pH 3,8) versetzt. Nach Zugabe von 0,33 ml (8,4 mmol) Blausäure wurde zur Bildung einer Emulsion am Magnetrührer bei Raumtemperatur heftig gerührt und die Reaktion mittels GC an einer Cyclodextrinsäule verfolgt. Nach 3 Stunden Reaktionszeit wurde Cyanhydrin mit 81,1 %ee und 48 % Umsatz gebildet.

Beispiel 13:

80 ml (34 units / mmol Aldehyd) einer wässrigen Enzymlösung mit rekombinanter R-HNL (34 units / mmol Aldehyd) wurden mit 10 ml 200 mM Kaliumphosphat / Natriumcitratpuffer pH 3,8 verdünnt und in eine auf 10 °C vorgekühlte Lösung aus 42,2 g (300 mmol) 2-Chlorbenzaldehyd und 42 ml tert-Butylmethylether gegeben. Anschließend wurden unter Rühren mit 950 rpm 19,6 ml (501 mmol) Blausäure innerhalb von 40 min in die Reaktionsmischung dosiert. Der Reaktionsverlauf wurde, nach Derivatisierung des Cyanhydrins mit Acetylchlorid, mittels GC an einer Cyclodextrinsäule verfolgt.

Stunden	% Umsatz	% ee
3,5	71,5	90,6
22	99,7	90

Vergleichsbeispiel :

0,25 bis 1 ml R-Oxynitrilase-Lösung (E.C.4.1.2.10; 2187 units/ml) wurden mit 50 mM Citrat/Phosphatpuffer (pH 4,0) auf 4 ml verdünnt und der pH-Wert der Enzym-Lösung gegebenenfalls mit einigen Tropfen Citronensäure-Lösung auf pH 4,0 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 3 ml tert.-Butylmethylether und 0,8g (5,69 mmol) 2-Chlorbenzaldehyd zugegeben und anschließend 445 µl (11,38 mmol) Blausäure zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde mittels Magnetrührer bei Raumtemperatur mit 900 rpm gerührt.

Der Umsatz und die Enantiomerenreinheit des gebildeten (R)-Cyanhydrins wurde mittels GC analysiert

Dazu wurde eine Probe der Reaktionslösung zentrifugiert und 50 µl der organischen Phase mit Dichlormethan verdünnt. Nach einer Derivatisierung mit Acetylchlorid wurde auf einer Cyclodextrinsäule gaschromatografisch analysiert.

Zeit (h)	0,25 ml Enzym entspricht 96 units / mmol Aldehyd		0,5 ml Enzym entspricht 192 units / mmol Aldehyd		1,0 ml Enzym entspricht 384 units / mmol Aldehyd	
	% Umsatz	%ee	% Umsatz	%ee	%Umsatz	%ee
1,5	79,1	77,5	97,6	81,6	98,7	89,4
3	98	77,4	100	81,5	100	89,1

Der Vergleichsversuch zeigte, dass bei Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine analog Beispiel 13 lediglich ein Zehntel der benötigten Menge an nativem Protein benötigt wird, um vergleichbare Enantiomerenreinheiten (ee-Werte) zu erzielen.

Patentansprüche:

1. Neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrillyase kodierende DNA-Sequenz, herstellbar durch eine Primerkombination aus einem Primer basierend auf der DNA-Sequenz der aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA und einem Primer basierend auf einer der DNA-Sequenzen der Isoenzyme aus *Prunus serotina*, anschließende Amplifikation und Klonierung.
2. Neue Gene nach Anspruch 1, herstellbar aus Primern basierend auf den Sequenzen eines der *mdl* Gene von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus*, anschließende Amplifikation und Klonierung
3. Neues Gen nach Anspruch 1, herstellbar aus Primern basierend auf den Sequenzen des *mdl5* Gens von *Prunus serotina* und des MDL1 Gens von *Prunus amygdalus*, anschließende Amplifikation und Klonierung, welches die in Figur 1 abgebildete Nukleotidsequenz aufweist oder mit dieser zumindest 80% identisch ist.
4. Rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression der genomischen DNA-Sequenz der *hnl* Gene aus *Prunus amygdalus* gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 in geeigneten Wirtszellen.
5. Rekombinante Proteine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine wirtsspezifische Glykosylierung aufweisen.
6. Rekombinante Proteine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Expression in einem eukaryontischen Mikroorganismus hergestellt werden.
7. Rekombinante Proteine nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Expression in einem Pilz hergestellt werden.
8. Rekombinantes Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein die aus der Nukleotidsequenz des Gens nach Anspruch 3 abgeleitete Aminosäuresequenz aufweist.

9. Verwendung einer DNA-Sequenz aus Proteinen nach Anspruch 4, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, zur sekretorischen Expression von heterologen Proteinen mit Hydroxynitrillyase-Aktivität in Wirtszellen.
10. Fusionsproteine bzw. heterologe Proteine mit Hydroxynitrillyase-Aktivität, die durch Verwendung einer DNA-Sequenz aus Proteinen nach Anspruch 4, die für das pflanzliche Signalpeptid von Rosacea spezie codiert, und durch sekretorische Expression derselben in Wirtszellen herstellbar sind.
11. Fusionsprotein nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Fusionsprotein die in Figur 4 abgebildete Nukleinsäuresequenz, bestehend aus Sequenzen des Gens nach Anspruch 3 und dem Glukoseoxidase-Gen von *Aspergillus niger*, sowie die aus dieser Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz gemäß Figur 5 aufweist.
12. Rekombinante Proteine nach Anspruch 4, die entweder am C-terminalen Ende verkürzt wurden oder bei welchen die Sequenzen im N- und C-terminalen Bereich durch solche eines verwandten Proteins mit anderen Funktionen ausgetauscht wurden.
13. Verwendung von Proteinen nach einem der Ansprüche 4-8 oder 10-12 zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen.
14. Verfahren zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen, dadurch gekennzeichnet, dass aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Aldehyde und Ketone in Anwesenheit eines Cyanidgruppendonors mit Proteinen nach einem der Ansprüche 4-8 oder 10-12 im organischen, wäßrigen oder 2-Phasensystem oder in Emulsion umgesetzt werden.



O.Z.1212

DSM Fine Chemicals Austria GmbH

12.01.01

Zusammenfassung

Neue Gene, enthaltend eine für Hydroxynitrilase kodierende DNA-Sequenz, herstellbar durch eine Primerkombination aus einem Primer basierend auf der DNA-Sequenz der aus Blütenmaterial von *Prunus amygdalus* gewonnenen cDNA und einem Primer basierend auf einer der DNA-Sequenzen der Isoenzyme aus *Prunus serotina*, anschließende Amplifikation und Klonierung, sowie rekombinante Proteine, herstellbar durch heterologe Expression der genomischen DNA-Sequenz dieser *hnl* Gene in geeigneten Wirtszellen und daraus abgeleitete Proteine und Fusionsproteine und Verwendung der Proteine zur Herstellung von (R)-Cyanhydrinen.

Figur 1

Nukleotidsequenz des durch PCR-Amplifikation gewonnenen *hnl5* Gens aus *Prunus amygdalus*.

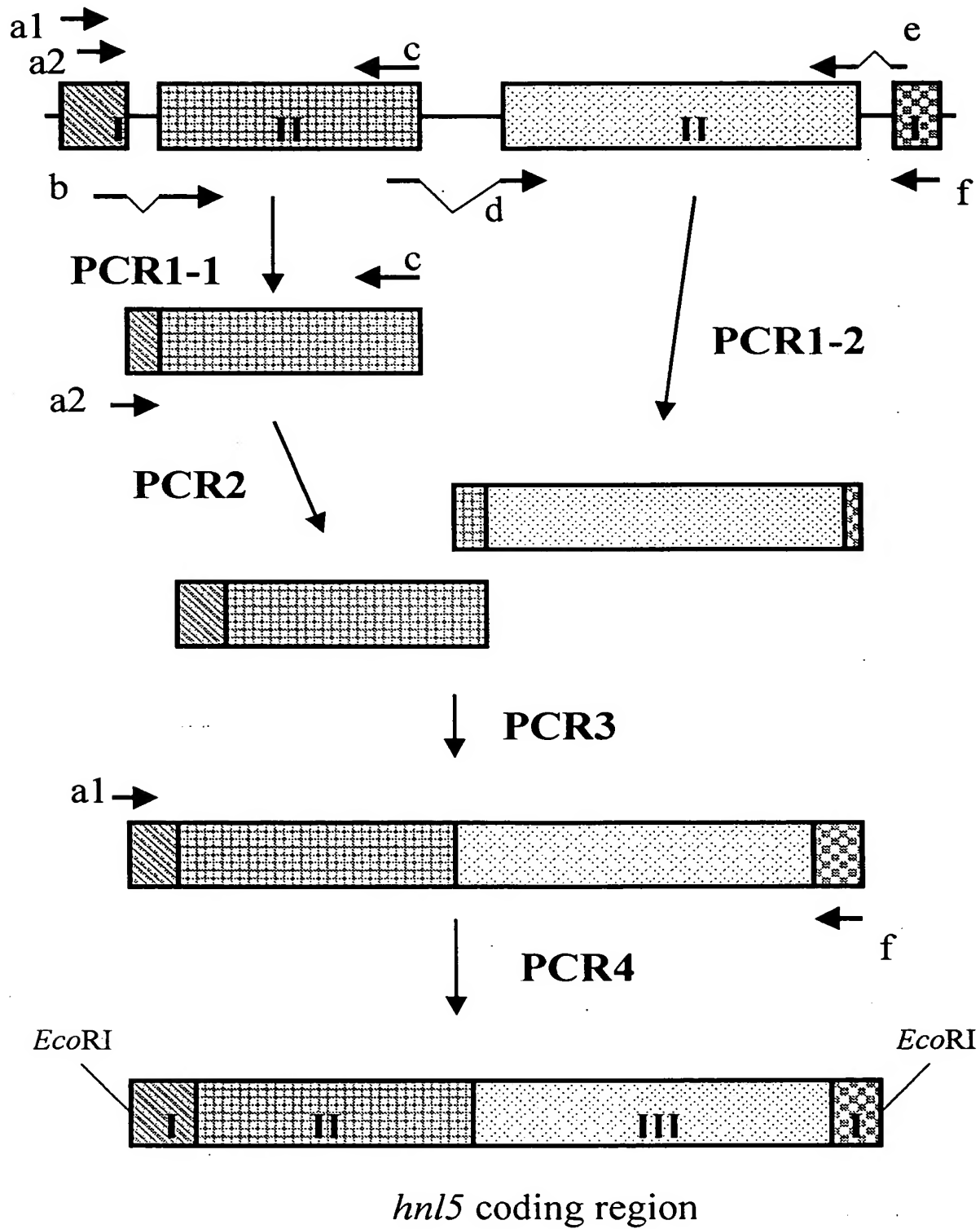
Das Startkodon (ATG) und das Stoppcodon des offenen Leserahmens sind fett gedruckt, die Nukleotide in den Intronbereichen sind in Kleinbuchstaben angegeben. Die über die PCR-Primer angefügten, nicht zum *hnl5* Gen gehörenden Randsequenzen sind unterstrichen. Die Splice sites der Introns wurden mit Hilfe der Consensus Sequenz „GT....AG“ identifiziert.

```
1   GGAATTCACA ATATGGAGAA ATCAACAATG TCAGTTATAC TATTTGTGTT
51  GCATCTTCTT GTTCTTCATC TTCAGTATTC AGAGGTTTAC TCGCTTGCCA
101  ATACTTCTGC TCATGgtaaa ttccatctt cagtattcat ttaacagcaa
151  aatgtgtaga ttataatta agaaaactga cacaagtagt gcaagaaaca
201  agctaattta gatgcatgtt gaaaaaaatc ttcatctct tcacatatat
251  ttgcagATT TTAGCTACTT GAAGTTTGTG TACAACGCCA CTGATACAAG
301  CTCGGAAGGA TCATATGACT ACATTGTAAT CGGTGGAGGA ACATCAGGGT
351  GTCCATTGGC AGCAACTTTA TCAGAAAAAT ACAAGGTGCT TCTTCTAGAA
401  AGAGGCACTA TTGCTACAGA ATACCCGAAC ACGTTGACTG CAGATGGGTT
451  TGCATATAAT CTGCAGCAAC AAGATGATGG AAAGACGCCA GTTGAAAGGT
501  TCGTGTCCGA AGATGGCATT GATAATGTGC GAGCCAGGAT CCTCGGTGGC
551  ACGACCATAA TCAATGCAGG CGTCTACGCC AGAGCTAACA TTTCATTCTA
601  TAGTCAAACA GGAATTGAAT GGGACCTGGA TTTGGTCAAT AAGACATATG
```

651 AGTGGGTTGA AGACGCCATT GTGGTCAAGC CAAATAATCA ATCTTGGCAA
701 TCTGTTATAG GAGAGGGATT CTTGGAGGCG GGTATTCTTC CAGACAATGG
751 ATTTAGTTTG GATCACGAAG CAGGAACTAG ACTCACCGGC TCAACTTTTG
801 ACAATAATGG AACGCGACAT GCGGCTGATG AACTGCTTAA TAAAGGAGAC
851 CCTAATAACT TGCTAGTTGC AGTTCAGGCC TCAGTAGAGA AGATCCTCTT
901 CTCTTCCAAT ACATCAA_{gta} tgtgcatca gtgatatta atggtagctc
951 ctagttgtc atgctgcact cgaaaattat tatttatca tttaaaata
1001 ctaacagaat agtgtgaagt ccatatttc ccttccatat ttcccaaatt
1051 tccataaaca aaacttccca attctccttc gtttagttg acaataatta
1101 taagctattc tdaatgcag ATTTGTCAGC TATTGGAGTC ATATATACGG
1151 ATTCTGATGG AACTCTCAT CAGGCATTTG TACGCGGTAA CGGAGAAGTT
1201 ATTGTTAGTG CAGGGACAAT CGGAACGCCT CAGCTTCTAC TACTTAGTGG
1251 CGTTGGACCA GAGTCTTACC TATCTTCTCT CAACATCACA GTTGTTTCAGC
1301 CGAATCCTTA TGTTGGGCAG TTTGTGTATG ACAATCCTCG TAATTCATT
1351 AATATTTTGC CCCCAAATCC AATTGAAGCC TCTGTTGTAA CTGTTTTAGG
1401 CATTAGAAGT GATTATTATC AAGTTTCTCT GTCAAGCTTG CCATTTTCCA
1451 CTCCACCCTT TAGTCTTTTT CCTACAACAT CTTACCCCTT CCCAAATTCG
1501 ACTTTTGCTC ATATTGTTAG CCAAGTTCCA GGACCATTGT CTCATGGTTC
1551 TGTCACGCTA AATTCATCAT CTGACGTGAG AATCGCTCCA AATATTAAAT
1601 TCAATTACTA TTCAAATTCC ACAGACCTTG CTAATTGTGT TAGCGGCATG
1651 AAGAAGCTTG GTGACTTATT AAGGACAAAG GCATTAGAAC CATATAAAGC

1701 TCGAGATGTG CTGGGAATTG ACGGTTTCAA TTATTGGGA GTACCTTTGC
1751 CAGAGAACCA AACAGATGAT GCATCCTTCG AAACATTTTG TCTAGATAAT
1801 GTAGCTTCAT ACTGGCATT A CCACGGTGGA AGCCTTGTTG GGAAAGTGCT
1851 TGATGACAGT TTCCGTGTTA TGGGGATCAA AGCATTACGC GTTGTTGATG
1901 CCTCCACTTT CCCTTACGAA CCAAACAGCC ATCCTCAGGG CTTCTATCTG
1951 ATGTTAGGAA Ggtatgtgat gcacacttc aaccactaga gattctcaat
2001 atttgtgtg tgtgtaatg aactctctgc cgcattgctc tttttatta
2051 atccttaaaa tttgtgtt tgcgagGTA TGTGGGCCTT CAAATCCTGC
2101 AAGAAAGGTC AATCCGGTTG GAGGCTATTC ATAATATTCA AGAGTCCATG
2151 TGAAGAATTC CG

Figur 2



Figur 3:

Aus der Nukleotidsequenz des *hnl5* Gens abgeleitete Aminosäuresequenz der Hydroxynitrilase (Hnl5) aus *Prunus amygdalus*. Die aus der Sequenzanalyse ermittelte Signalsequenz ist fettgedruckt und die postulierte Prozessierstelle ist mit einem Pfeil markiert. Die möglichen Glykosylierungsstellen (PROSITE patterns) sind unterstrichen.



MEKSTMSVILFVLHLLVLHLQYSEVHSLNTSAHDFS~~YLK~~FVYNATDTSS~~EGSYDYI~~
VIGGGTSGCPLAATLSEKYKVLLLERGTIATEYPNTLTADGFAYNLQQQDDGKTPVE
RFVSEDGIDNVRARILGGTTIINAGVYARANISFYSQTGIEWDL~~DLVN~~KTYEWVEDAI
VVKPNNQSWQSVIGEGFLEAGILPDNGFSLDHEAGTRLTGSTFDNNGTRRHADELL
NKGDPNNLLVAVQASVEKILFSSNTSNLSAIGVIYTDSDGNSHQAFVRGNGEVIVSA
GTIGTPQLLLLSGVGPE~~SYL~~SSLNITVQPNPYVGQFVYDNPRNFINILPPNPIEASVV
TVLGIRSDYYQVSLSSLPFSTPPFSLFPTTSYPLPNSTFAHIVSQVPGPLSHGSVTLN
SSSDVRIAPNIKFNYYSNSTDLANCVSGMKKLGDLLRTKALEPYKARDVLGIDGFNY
LGVPLPENQTDDASFETFCLDNVASYWHYHGGSLVGKVLDDSFVRVMGIKALRVVD
ASTFPYEPNSHPQGFYLM~~LG~~RYVGLQILQERSIRLEAIHNIQESM

Figur 4:

Nukleinsäuresequenz des für ein sekretorisches Hybridprotein (PamHNL5xGOX) mit Hnl-Aktivität codierenden DNA Fragments, bestehend aus Sequenzen des *hnl5* Gens von *Prunus amygdalus* und dem Glukoseoxidasegen von *Aspergillus niger*.

```

gaattcatcatgcagactctccttgtagctcgcttggtctccctcgctgcggccctgc-
cacactacatcaggagcaatggcattgaagcctacaacgccactgatacaagctcggaag-
gatcatatgactacattgtaatcgggtggaggaacatcaggggtgtccattggcagcaactt-
tatcagaaaaatacaaggtgcttctctagaaagaggcactattgctacagaatacccgaa-
cacgttgactgcagatgggtttgcatataatctgcagcaacaagatgatggaaagacgc-
cagttgaaagggttcgtgtccgaagatggcattgataatgtgagagccaggatcctcggtgg-
cacgaccataatcaatgcaggcgtctacgccagagctaacatttcattctatagtcaaa-
caggaattgaatgggacctggatttggtcaataagacatatgagtgggtgaagacgc-
catttggtcaagccaaataatcaatcttggaatctgttataggagagggattcttgag-
gcgggtattctccagacaatggatttagtttgatcacgaagcaggaactagactcaccg-
gctcaacttttgacaataatggaacgcgacatgcggctgatgaactgcttaataaag-
gagaccctaataactgctagttgcagttcaggcctcagtagagaagatcctcttctctc-
caatacatcaaatttgtagctattggagtcatatatacggattctgatggaaactctcat-
caggcatttgtagcgcgtaacggagaagttattgtagtgagggaacaatcggaacgcct-
cagcttctactacttagtggcgttgaccagagtcctacctatcttctcaacatcacag-
ttgttcagccgaatcctatgttgggcagttgtgtatgacaatcctcgtaatttcattaa-
tatttgcacccaaatccaattgaagcctctgttgtaactgttttaggcattagaagtgat-
tattatcaagtttctgtcaagcttgccattttccactccacccttagtcttttctcta-
caacatcttaccctcccaaatcgcacttttgctcatattgttagccaagtccaggac-
cattgtctcatggttctgtcacgctaaattcatcatctgacgtgagaatcgctccaaatat-
taaattcaattactattcaaattccacagaccttgctaattgtgttagcgcatgaagaag-
cttggtgacttattaaggacaaaggcattagaaccatataaagctcgagatgtgctgg-
gaattgacgggttcaattatttgggagtagcttgccagagaaccaaacagatgatgcatc-
cttcgaaacattttgtctagataatgtagcttcatactggcattaccacgggtggaagcc-
ttgttgggaaagtgttgatgacagttccgtgttatggggatcaaagcattacgcgttg-
ttgatgcctccactttcccttacgaaccaaacagccatcctcagggcttctatctgatgt-
taggaagggtatgtgggccttcaaactctgcaagaaaggtaatgcagtgagcggccgcatgcgaattc

```

Figur 5: Aus der Nukleinsäuresequenz (Figur 4) abgeleitete Aminosäuresequenz des Hybridproteins PamHNL5xGOX.

MQTLLVSSLVSVSLAAALPHYIRSNGIEAYNATDTSSEGSYDYIVIGGGTSGCPLAATL
SEKYKVLLLERGTIATEYPNTLTADGFAYNLQQQDDGKTPVERFVSEDGIDNVRARI
LGGTT!!NAGVYARANISFYSTGIEWDLDLVNKTYEWWEDAIVKPNQSWQSVIG
EGFLEAGILPDNGFSLDHEAGTRLTGSTFDNNGTRHAADELLNKGDPNNLLVAVQA
SVEKILFSSNTSNLSAIGVIYTDSDGNSHQAFVRGNGEVIVSAGTIGTPQLLLLSGVG
PESYLSSLNITVVQPNPYVGQFVDNPRNFINILPPNPIEASVTVLGIRSDYYQVSL
SLPFSTPPFSLFPTTSYPLPNSTFAHIVSQVPGPLSHGSVTLNSSSDVRIAPNIKFN
YSNSTDLANCVSGMKKLGDLLRTKALEPYKARDVLGIDGFNYLGVPLPENQTDDAS
FETFCLDNVASYWHYHGGSLVGKVLDDSFVRVMGIKALRVVDASTFPYEPNSHPQG
FYMLLGRYVGLQILQERSMQ

Figur 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hnl5 aus *Prunus amygdalus* und des Hybridproteins PamHNL5xGOX. Sequenzanteile der Glukoseoxidase von *Aspergillus niger* sind unterstrichen. Sequenzbereiche die zwischen den beiden Proteinen keine signifikante Homologie aufweisen sind kursiv, die Signalpeptide fett gedruckt.

PamHNL5Gox 1 **mqtlivsslv vslaaalphy irsnqiea**----- --YNATDTSS

PamHNL5 1 ***mekstmsvil fvhlvlhl qysevhsian tsahdfsylk fv***YNATDTSS

PamHNL5Gox 37 EGSYDYIVIG GGTSGCPLAA TLSEKYKVLL LERGTIATEY PNTLTADGFA

PamHNL5 51 EGSYDYIVIG GGTSGCPLAA TLSEKYKVLL LERGTIATEY PNTLTADGFA

PamHNL5Gox 87 YNLQQQDDGK TPVERFVSED GIDNVRARIL GGTTIINAGV YARANISFYs

PamHNL5 101 YNLQQQDDGK TPVERFVSED GIDNVRARIL GGTTIINAGV YARANISFYs

PamHNL5Gox 137 QTGIEWDLDL VNKTYEWWED AIVVKPNNQS WQSVIGEGFL EAGILPDNGF

PamHNL5 151 QTGIEWDLDL VNKTYEWWED AIVVKPNNQS WQSVIGEGFL EAGILPDNGF

PamHNL5Gox 187 SLDHEAGTRL TGSTFDNNGT RHAADPELLNK GDPNNLLVAV QASVEKILFS

PamHNL5 201 SLDHEAGTRL TGSTFDNNGT RHAADPELLNK GDPNNLLVAV QASVEKILFS

PamHNL5Gox 237 SNTSNLSAIG VIYTDSDGNS HQAFVRNGE VIVSAGTIGT PQLLLLSGVG

PamHNL5 251 SNTSNLSAIG VIYTDSDGNS HQAFVRNGE VIVSAGTIGT PQLLLLSGVG

PamHNL5Gox 287 PESYLSSLNI TVVQPNPYVG QFVYDNPRNF INILPPNPIE ASVTVLGIR

PamHNL5 301 PESYLSSLNI TVVQPNPYVG QFVYDNPRNF INILPPNPIE ASVTVLGIR

PamHNL5Gox 337 SDYYQVSLSS LPFSTPPFSL FPTTSYPLPN STFAHIVSQV PGPLSHGSVT

PamHNL5 351 SDYYQVSLSS LPFSTPPFSL FPTTSYPLPN STFAHIVSQV PGPLSHGSVT

PamHNL5Gox 387 LNSSSDVRIA PNIKFNYYSN STDLANCVSG MKKLGDLLRT KALEPYKARD

PamHNL5 401 LNSSSDVRIA PNIKFNYYSN STDLANCVSG MKKLGDLLRT KALEPYKARD

PamHNL5Gox 437 VLGIDGFNYL GVPLPENQTD DASFETFCLD NVASYWHYHG GSLVGKVLDD

PamHNL5 451 VLGIDGFNYL GVPLPENQTD DASFETFCLD NVASYWHYHG GSLVGKVLDD

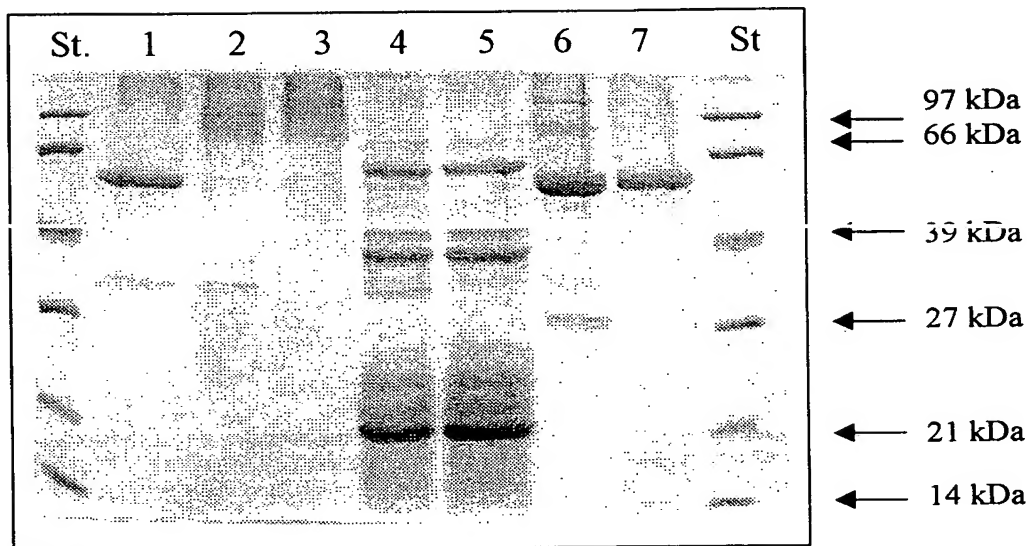
PamHNL5Gox 487 SFRVMGIKAL RVVDASTFPY EPNSHPQGFY LMLGRYVGLQ ILQERS*mq*--

PamHNL5 501 SFRVMGIKAL RVVDASTFPY EPNSHPQGFY LMLGRYVGLQ ILQERS*irle*

PamHNL5Gox 535 -----

PamHNL5 551 *aihniqesm*

Figur 7: Analyse von Hnl Präparationen durch SDS-PAGE. Details sind im Beispiel 11 beschrieben.



Helmut SCHWAB et al.

WENDEROTH, LIND & PONACK, L.L.P.
2033 "K" Street, NW,
Suite 800
Washington, D.C. 20006
(202) 721-8200

Filed January 16, 2002
Serial No.[NEW]

Atty Docket 2001_1882A